

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720061152244

UDC_

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

融合蛋白 (CREKA)₃-tTF 选择性诱发肿瘤
组织血管栓塞

Selective Thrombosis in Tumor Blood Vessels Induced by
Fusion Proteins (CREKA)₃-tTF

苏 毅

指导教师姓名: 颜江华 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 6 月

论文答辩时间: 2009 年 7 月

学位授予日期: 2009 年

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学抗癌中心颜江华)课题(组)的研究成果,获得(颜江华)课题(组)经费或实验室的资助,在(颜江华)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

利用靶向性血栓药物对实体瘤血管的选择性栓塞是一种新颖的抗肿瘤策略。该策略以截短的组织因子(truncated Tissue Factor, tTF)为效应因子,结合肿瘤血管靶向载体实现选择性诱发肿瘤组织血管栓塞,阻断肿瘤营养物质和氧气的供给,引发肿瘤缺血性坏死,达到抗肿瘤作用。

这种策略需要靶向至肿瘤血管的载体。CREKA 五肽能够特异性结合肿瘤血管中的凝血血浆蛋白,具有良好的肿瘤血管靶向作用,是一个理想的载体。我们通过构建 CREKA 与 tTF 融合蛋白来探讨这种融合蛋白是否能够选择性诱发肿瘤组织血管栓塞从而达到抗肿瘤作用。

首先运用生物信息学的方法对两者构成的融合蛋白进行分子模拟,从理论上选定最优的融合蛋白构建模式。随后,利用 PCR 技术构建了含有 CREKA 和 tTF 的融合基因,并将其克隆入 pET22b(+)中。通过大肠杆菌表达(CREKA)₃-tTF 融合蛋白,并经镍亲和层析柱,及梯度透析复性获得纯的融合蛋白。然后,利用凝血时间,FX 活化和结合荧光定量测定等实验在体外初步探讨了该融合蛋白的活性。RBITC 荧光标记融合蛋白,利用活体成像仪观察荧光标记融合蛋白在 S180 移植瘤的小鼠模型的分布,组织切片法结合共聚焦荧光显微镜分析融合蛋白的组织定位。用融合蛋白治疗 S180 移植瘤的小鼠模型,组织切片法分析融合蛋白对肿瘤组织血管的栓塞作用。

依据分子模型结果选定 CREKA 与 tTF 的组成模式为(CREKA)₃-G₄S -tTF。PCR 技术构建融合基因,测序验证获得正确重组载体,并成功表达于 *E.coli* BL21。凝血时间测定和 FX 活化实验证实融合蛋白具有凝血活性,荧光定量实验证实融合蛋白能够与凝血血浆蛋白结合。活体成像显示融合蛋白主要分布于肿瘤组织中,组织切片的荧光定位证实融合蛋白定位于肿瘤组织血管内。融合蛋白治疗组小鼠的病理组织切片中观察到肿瘤组织部分血管血栓栓塞,而在其他正常组织上未观察到血管血栓。在 S180 移植瘤的小鼠模型治疗中,该融合蛋白能够地抑制 S180 肿瘤生长。

上述实验结果表明(CREKA)₃-tTF 融合蛋白是一种肿瘤血管靶向性的血栓蛋白,能够选择性诱导肿瘤血管血栓,并产生一定的抗肿瘤作用。

关键词: CREKA; tTF ; 靶向治疗; 肿瘤血管

Abstract

It is a promising anti-tumor strategy to selectively shut down the blood vessels of tumors. This strategy use truncated Tissue Factor (tTF) as the effector, which combined with tumor vessels targeting carrier to selectively induce thrombosis in tumor vasculature and cut off the nutrition or oxygen supplies of tumor, subsequently result in necrosis of the tumor and obtained anti-tumor effects.

The specific ligands are needed to deliver tTF to tumor vessels in the strategy. The CREKA peptide can target of resident clotted plasma proteins in the tumor vasculature. So the CREKA is a well deliver for tTF. It is expected that CREKA/tTF fusion protein has anti-tumor effects by selectively inducing thrombosis in tumor vasculature.

Firstly, The CREKA/tTF fusion proteins were designed and analysed by molecular simulations using bioinformatics applications. The optimal model was chose to build Secondly, The CREKA/tTF fusion gene was reconstructed by PCR technology and cloned into pET22b(+). Then the CREKA/tTF fusion protein was expressed in *E.coil* BL21 and purified by His SpinTrap columns. After purify, the fusion protein was refold by subsequent dialysis. Thirdly, the activities of the fusion proteins were measured by coagulation timing, FX activation, and quantitative fluorescence test *in vitro*. Fourthly, the distribution of the RBITC-labelled proteins in mice bearing a grafted S180 tumor was examined by whole-animal imaging. And the localization of the RBITC-labelled protein in tissues was observed by laser scanning confocal microscope. Finally, the effect of the protein to selectively induce thrombosis in tumor vasculature was examined by histologic analysis.

The (CREKA)₃-G₄S -tTF model is chose on the result of molecular simulations. Both the protein fragments of CREKA and tTF in the chose model are analysed to be effective of their function by molecular simulations. Then we successfully build the gene sequence in pET22b(+) and express the protein in the *E.coil* BL21. The coagulation of the fusion protein show in the coagulation test and FX activation test. And the capability of the fusion protein effectively binding to clotted plasma proteins

is identified in quantitative fluorescence test. The whole-animal imaging shows the fusion protein is only in the tumor and slices fluorescent indicates the fusion protein is in tumor vessels. In histochemical analysis thrombosis of tumor blood vessels in (CREKA)₃-tTF treated mice is observed, but not in other normal tissues. A significant reduction in tumor growth rate is observed in (CREKA)₃-tTF treated group, compared with control.

In conclusion, our results demonstrate that the (CREKA)₃-tTF is the protein that can target to tumor and cause selectively vascular occlusion in the tumor vessels to gain antitumor effects.

Keywords: CREKA; tTF ; target therapy; tumor vasculature

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要.....	I
ABSTRACT	II
第一章 前言	1
一 肿瘤	1
二 肿瘤治疗	2
2.1 癌症治疗现状.....	2
2.2 以血管系统为靶点的治疗.....	3
2.3 选择性阻断肿瘤血管药物（VDAs）的进展.....	7
三 靶向载体的寻找	15
3.1 噬菌体展示肽库技术.....	15
3.2 CREKA 肽	16
四 以 tTF 作为效应因子的肿瘤血管靶向治疗.....	17
4.1 组织因子.....	17
4.2 截短的组织因子 tTF.....	20
4.3 tTF 阻断肿瘤血管的研究进展.....	20
五 本论文的研究内容	21
第二章 融合蛋白的表达及其活性鉴定.....	23
一 材料与方法	23
1. 材料与试剂.....	23
2 方法.....	28
二 结果与分析	40
1.1 蛋白结构与功能预测.....	40
1.2 基因构建.....	44
1.3 蛋白的表达及纯化.....	49
1.4 蛋白的活性鉴定.....	54
三 讨论	57

第三章 融合蛋白在体内的分布和抗肿瘤分析	59
一 材料和方法	59
1 材料.....	59
2.方法.....	60
二 结果与分析	65
1.1 融合蛋白(CREKA) ₃ -tTF 的活体荧光定位.....	65
1.2 融合蛋白(CREKA) ₃ -tTF 的组织切片荧光定位.....	66
1.3(CREKA) ₃ -tTF 的病理学观察.....	68
1.4 (CREKA) ₃ -tTF 对肿瘤的治疗.....	69
三 讨论	70
总结与展望.....	73
参考文献.....	74
致 谢.....	82
附 录.....	83

厦门大学博士论文摘要库

CONTENTS

ABSTRACT IN CHINESE	I
ABSTRACT IN ENGLISH.....	II
CHAPTER I INTRODUCTION	1
I . TUMOR	1
II. TREATMENT OF CANCER.....	2
2.1 Tumor treatment.....	2
2.2 Tumor vascular targeting therapy	3
2.3 Vascular disrupting agents	7
III DIRECTED LIGAND	15
3.1 Phage-displayed libraries screening.....	15
3.2 CREKA peptide	16
IV TARGETED DELIVERY OF TISSUE FACTOR	17
4.1 Tissue factor.....	17
4.2 Truncated tissue factor	20
4.3 Selective thrombosis of tumor blood vessels by tTF	20
V THE PURPOSE AND CONTENT OF THIS THESIS.....	21
CHAPTER II EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF FUSION PROTEINS	23
I MATERIALS AND METHODS.....	23
1. Materials and regents	23
2 Methods.....	28
II RESULTS AND ANALYSIS.....	40
1.1 Protein structure prediction.....	40
1.2 Construction of genes	44
1.3 Expression and purification of proteins with high yield	49

1.4 Analysis of proteins' activity	54
III DISCUSSION	57
CHAPTER III STUDIES IN MOUSE TUMOR MODELS	59
I MATERIALS AND METHODS.....	59
1 Materials and regents	59
2. Methods.....	60
II RESULTS AND ANALYSIS.....	65
1.1 Whole-animal imaging analysis.....	65
1.2 Fluorescence staining.....	66
1.3 Histological studies.....	68
1.4 Treatment studies in mouse tumor models.....	69
III DISCUSSION	70
CONCLUSION	73
REFERENCES	74
ACKNOWLEDGEMENT	82
APPENDIX	83

第一章 前言

一 肿瘤

1971年, Folkman 提出了肿瘤生长依赖于血管新生的假说^[1]。其后, 证实肿瘤的生长有两个明显不同的阶段, 即从无血管(avascular stage)的缓慢生长阶段转变为有血管(vascular stage)的快速增殖阶段。在无血管期肿瘤生长主要依靠周围正常组织的弥散供给营养物质和氧气, 肿瘤生长缓慢, 细胞数不超过 10^5 , 体积不超过 $1-2 \text{ mm}^3$, 而这正是血液中营养物质和氧气通过弥散作用所能达到的范围, 无血管期的肿瘤没有转移能力, 处在“休眠”期。从无血管期到血管期的转化称为“血管生成开关”^[2], 一旦进入血管期, 肿瘤细胞释放多种血管生成因子, 肿瘤血管生成, 肿瘤通过新生血管得到丰富的营养物质和氧气, 并排走代谢产物, 肿瘤体积呈指数倍增长; 肿瘤还利用新生血管作为转移的方式, 通过血液循环将原发癌细胞输送到转移靶器官, 使转移成为可能^[3]。肿瘤血管形成对实体瘤生长、转移的影响可以从营养供应, 细胞凋亡和细胞因子三方面来认识。

Stephen 等通过对肿瘤血管系生成过程的研究指出, 血管生成不但是肿瘤生长所必须, 且肿瘤细胞与新生血管系统的接触还是导致肿瘤远处转移的原因^[4]。肿瘤侵袭转移是一复杂的多阶段过程, 可以概括为: 原发瘤增殖、肿瘤新生血管生长; 瘤细胞侵袭基底膜; 穿入血管或淋巴管; 在循环系统中存活, 形成瘤栓并转运到远隔靶器官; 滞留于靶器官的微小血管中; 穿出血管并形成微小转移灶; 肿瘤血管形成, 转移瘤灶增殖。可见在肿瘤发生侵袭转移的多步骤过程中, 无论肿瘤转移的起始或终末阶段, 血管生成均发挥着重要作用

Holmgren 等发现, 在肿瘤血管前期, 瘤体内细胞凋亡速度很高, 与增殖速率相平衡, 因而肿瘤组织整体的增长速度很慢; 而一旦有新生血管长入, 这种平衡就被打破了, 凋亡减少而增殖加快, 结果表现为肿瘤的快速生长与远处转移^[5]。血管生成过程涉及一系列形态学及生化学改变。形态学改变包括内皮细胞降解母体小静脉的基底膜、内皮细胞的定向运动、发生有丝分裂、血管腔形成、芽式生长并形成血管襻、产生新的基底膜、外膜细胞的形成等一系列步骤。血管新生模型的组织学观察发现血管新生有几个明显的分期: ①血管通透性增加引起血浆蛋白外渗(extravasation)及周围细胞外基质的降解; ②排列于已存血管腔面的内皮细

胞开始从亲代母血管向血管新生刺激物方向游走迁移。位于迁移游走前沿后面的内皮细胞增生，而位于最邻近新毛细血管的内皮细胞开始分化形成新的管腔。新形成的管腔将最终开放与血流相通。继而一些毛细血管不断延伸，另一些因回流量较低而收缩消失。通常情况下，内皮细胞处于休眠状态，是体内极度静止的细胞。内皮细胞的更新需要数百天，而骨髓细胞的更新平均只需 5 天，分裂速率约 6×10^9 细胞/h。血管生成中，微血管内皮细胞的增殖速度同骨髓细胞相同，测定大鼠灌流视网膜和心肌的毛细血管的增殖指数分别为 0.01% 和 0.14%。然而，在血管增生性或糖尿病性视网膜病、类风湿关节炎或肿瘤增长发展等病理学过程中，内皮细胞的增殖指数达 9%-20%。

Nomura 等研究发现血管内皮细胞 (EC) 分泌的血管生长因子可促进肿瘤细胞的生长^[6]。新生血管灌流(perfusion)对肿瘤生长的影响效果已在耳室和角膜实验模型研究中得以证实。植入角膜无血管部位几天后，肿瘤块诱发新毛细血管从角膜(limbus)开始生长，新生成的小动脉长至肿瘤，与静脉连接并维持其功能灌流，这时肿瘤体积开始呈几何级数性增长。3H-胸腺嘧啶掺入实验研究表明，小鼠体内移植肿瘤中的癌细胞有丝分裂指数以位于血管周围的癌细胞为高，肿瘤内血管内皮细胞增殖率约高于相应组织正常血管的 200 倍。

肿瘤的血管作用正日益受到广泛重视。已经有一些关于肿瘤血管依赖性的证据，并发现血管新生受控于一系列正负调节因子。正常细胞是非血管新生性的(nonangiogenic)，无论是在癌前期还是癌变转化期都必须发生从非血管新生性到血管新生性的表型转换，肿瘤才能得以生长。

二 肿瘤治疗

2.1 癌症治疗现状

癌症目前是人类健康的一大杀手。根据世界卫生组织公布的统计数据，2007 年全球约有七百九十万人死于癌症，占该年死亡人数的 13%。估计到了 2030 年死于癌症的人数将会达到一亿两千万。癌症治疗方法的进展主要来自于临床实验的结果。对于现在癌症患者来说，手术、放疗、化疗依然是基本方法^[7]。但是手术仅对早期肿瘤可达到根治，而真正对放疗、化疗敏感的癌症只占人类全部癌症的百分之十左右。然而绝大多数的癌症患者确诊时都已处于中晚期，失去了手术

的最佳时期。特别是大部分肿瘤，尤其是老年人的肿瘤恶性度并不高、生长缓慢，对放疗、化疗不甚敏感。现在许多晚期癌症患者采取手术、放疗、化疗相联合的治疗办法，这种综合治疗方法已经获得肯定。但仍然有很多癌症是不能治愈的，这就需要其他的治疗方法。在历史上，发展抗肿瘤治疗的途径主要集中于如何促使肿瘤细胞死亡。

最近另外一种治疗途径受到了人们相当的关注。这一策略不是直接针对恶性肿瘤细胞群，而是竭力通过作用于肿瘤血管网络而破坏肿瘤的营养支撑系统。以血管为靶点的途径基于这样一种认识：连续的不断扩张的血管系统对肿瘤的发展及转移是至关重要的。人们的确已经广泛接受了这样的认识：在缺乏血管生长时大多数肿瘤处于休眠状态，病灶大小局限在几毫米以内。因此以肿瘤血管系统为靶点的治疗潜力就已经很明确了。针对血管系统的靶向治疗领域正在迅速扩张并开发出大量探索性的药物，这些药物不同于传统的抗肿瘤手段，如放射治疗及细胞毒药物。实际上血管系统靶向治疗已成为标准治疗方案的补充，它为开发有效的肿瘤治疗疗法提供了独特的机会。不难想象在将来晚期肿瘤患者的最终治疗手段中，可能不仅包括手术治疗，放射治疗及化学治疗，还包括血管靶向治疗^[7]。

2.2 以血管系统为靶点的治疗

2.2.1 血管靶向治疗

大多数肿瘤研究的目的在于开发直接杀死肿瘤细胞或者使其停止增殖的方法。为了成功地控制肿瘤，药物必须到达每一个能无限制增殖的肿瘤细胞，将其杀死或阻止其分裂。即便是仅仅 1cm^3 非常小的肿瘤亦有 10^9 的细胞。由于难以达到这一点，人们不得不寻找那些以肿瘤细胞为靶点的药物，通过影响宿主细胞的功能来间接针对肿瘤细胞的研究途径，例如免疫应答和血管内皮细胞。

实体瘤的进行性生长依赖血管网的建立和发展^[3]。血管形成确保肿瘤代谢的进行，对肿瘤增殖必不可少。许多新生血管形成，包括肿瘤血管的产生都是需要特殊生长因子的释法来触发血管生成，如 VEGF，其由宿主细胞的巨噬细胞或肿瘤细胞自身产生。由此产生了一种抗肿瘤策略，就是针对肿瘤血管生成过程中某些因子及其关键步骤进行干扰或抑制，从而减少或抑制肿瘤的血管生成。这种阻止肿瘤血管生成策略，称为抗血管生成治疗。它的目的在于抑制肿瘤引发的血管

生成过程本身。新生血管抑制剂(Angiogenesis Inhibitors, AIs), 旨在破坏血管新生过程, 特别是肿瘤、内皮细胞和基质细胞间的信号转导以及内皮细胞的功能, 从而阻止新生血管的形成。下列药物的应用正在研究中: 干扰血管生成激活因子的传递或输出的药物、抑制血管生成因子或使其释放后失活的抗体、抑制受体活性的药物、浸润过程的抑制剂以及抑制内皮细胞增殖的药物, 这类药物正在进行临床评价中。目前, 新生血管抑制剂包括两类药物, 其一是单克隆抗体, 其二是小分子酪氨酸激酶抑制剂。贝伐单抗(Bevacizumab)是 VEGF 的人源单克隆抗体, 与化疗联合用于治疗结直肠癌、非小细胞肺癌和乳腺癌^[8]。索拉非尼(Sorafenib)和舒尼替尼(Sunitinib)是具有代表性的多靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂, 被批准用于治疗肾癌^[9]、肝癌和胃肠道间质瘤^[10]。理论上, 新生血管抑制剂对已形成的肿瘤血管无明显治疗作用, 不能彻底根除全部肿瘤细胞; 新生血管抑制剂适用于有高度新血管生成倾向的情况下, 例如术后辅助治疗和晚期肿瘤, 且需要长期用药。因此, 目前的新生血管抑制剂通常需要与化疗药物联合用药, 才能更有效的杀伤肿瘤组织, 如贝伐单抗, 恩度等药物。

另一种治疗策略则是针对已经建立的肿瘤血管网络, 这一类包括选择性破坏已建立的肿瘤血管网络的治疗手段, 这些血管阻断剂(vascular-disrupting agents, VDAs)的目的在于选择性的快速和毁灭性关闭肿瘤中的血管系统, 通过阻断血流剥夺肿瘤细胞的氧和营养物质供给, 阻碍废物排泄, 从而导致肿瘤细胞继发死亡。

尽管 AIs 和 VDAs 都是以肿瘤血管系统为靶点, 但是了解影响血管生成的药物和选择性破坏存在的血管系统的药物之间的关键区别是十分重要的。这些区别不仅仅在于他们起效的方式不同, 而且它们可能的治疗应用也不同(图 1)。简而言之, 抗血管生成治疗目的在于影响新生血管的生成, 从而阻止肿瘤生长并且限制其转移的潜能, 因此抗血管生成治疗通常需要应用数月至数年; 而 VDAs 可影响已经存在的肿瘤血管, 并且具有破坏肿瘤负荷及抑制肿瘤进展的潜能, 这类药物被设计为间断性使用而不是长期使用。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库